



Genvinset®

HLA Narcolepsy

NÁVOD K POUŽITÍ

*Souprava pro detekci skupiny alel
HLA- DQB1*06:02*

Pro diagnostické použití in vitro

Rev. 06/ 2023-10-13



Camino del Pilón 86, Casa 7, Local
50011 - Zaragoza
(Španělsko)



www.bdrdiagnostics.com



Kód produktu:

GVS-NP-48 (48 testů)

GVS-NP-24 (24 testů)

UDI-DI:

8437016942161

8437016942154

Obchod:

Od -30 °C do -18 °C

Genvinset®

HLA narkolepsie

Index

1- Informace o bezpečnosti	2
2- Zamýšlené použití	2
3- Shrnutí a vysvětlení	3
4- Zásady postupu.....	3
5- Obsah sady	4
6- Skladování soupravy	4
7- Požadované, ale nedodané materiály	4
8- Odběr a příprava vzorků.....	5
9- Postupy použití	5
10- Výsledky.....	7
11- Kontrola kvality	8
12- Specifické provozní údaje.....	9
13- Omezení postupu	11
14- Průvodce řešením problémů	11
15- Odkazy.....	13
16- Upozornění pro kupujícího	13
17- Kontrola změn	14
18- Vysvětlení symbolů použitých na štítcích	14

1- Informace o bezpečnosti

Přečtěte si prosím kompletně tento návod k použití a dodržujte jej při používání této IVD soupravy.

Soupravu IVD mohou používat odborníci, kteří mají dobré zkušenosti s analýzou DNA a interpretací genetických výsledků.

V případě pochybností ohledně popisu metody stanovení se obraťte na výrobce. Kontaktujte na telefonním čísle +34 976 094 603 nebo na e-mailové adrese customersupport@bdrdiagnostics.com.

Souprava IVD má omezenou dobu použitelnosti. Před použitím soupravy se ujistěte, že doba použitelnosti neuplynula. Reagencie ze soupravy po uplynutí doby použitelnosti by mohly být znehodnoceny, což by mohlo zhoršit výsledky. Reagencie s prošlou dobou použitelnosti zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.

Kontaminace vzorku nebo činidla může vést k nesprávným výsledkům. Při extrakci DNA a manipulaci se vzorkem a činidly buďte opatrní.

Tato sada se může při přepravě nebo skladování poškodit. V případě podezření na poškození během přepravy soupravu nepoužívejte. Pečlivě dodržujte podmínky skladování popsané na štítku a v příručce IFU (návod k použití).

Zajistěte, aby bylo s odpadem nakládáno v souladu s místními předpisy. Nesprávné nakládání s odpadem může vést ke kontaminaci životního prostředí.

Toxikologické vlastnosti soupravy nebyly důkladně prozkoumány, proto se doporučuje vyhnout se kontaktu s kůží a sliznicemi. Nepožívejte. Na vyžádání jsou zákazníkovi k dispozici Bezpečnostní listy (MSDS).

Ujistěte se, že tato souprava je vhodná pro analýzu požadovanou klinickým lékařem.

2- Zamýšlené použití

Genvinset® HLA Narcolepsy je poloautomatická diagnostická souprava in vitro pro kvalitativní detekci skupiny alel HLA-DQB1*06:02 v genomové DNA extrahované z plné krve, která je spojena s predispozicí k narkolepsii, pomocí PCR v reálném čase s využitím technologie sond TaqMan®.

U pacienta, kterého doporučí příslušný odborný lékař (neurolog, otolaryngolog nebo pneumolog), a s přihlédnutím ke slučitelnosti uváděných příznaků; nadměrná denní spavost (lidé s narkolepsií usínají bez varování, kdekoli a kdykoli), náhlá ztráta svalového tonu, spánková paralýza, změny spánkového cyklu s rychlými pohyby očí (REM) a halucinace a/nebo jeho rodinná anamnéza (například přímý potomek s diagnózou narkolepsie), může být provedeno stanovení HLA-DQB1*06:02. Výsledky tohoto testu by neměly být jediné, na nichž je založeno terapeutické rozhodnutí, a měly by být použity jako pomůcka při diagnostice spolu s výsledky dalších markerů onemocnění.

Předpokládaným uživatelem soupravy je technický personál vyškolený k provádění pracovního postupu a interpretaci výsledků popsaných v tomto dokumentu.

3- Shrnutí a vysvětlení

Narkolepsie je autoimunitní porucha, která postihuje přibližně 0,02 až 0,05 % světové populace, přičemž v některých zeměpisných oblastech, jako je Izrael, je její prevalence nižší a v jiných, například v Japonsku je mnohem vyšší¹.

Narkolepsie je charakterizována nadměrnou denní spavostí a je běžně pozorována spolu s kataplexií nebo epizodickou slabostí, která se vyskytuje u 60 až 80 % pacientů s narkolepsií. Mezi další příznaky patří spánková paralýza, hypersomie, poruchy spánku, abnormální spánek s rychlými pohyby očí a halucinace².

Jeden z nejdůležitějších pokroků v objasnění příčiny narkolepsie přišel s objevem hypokretinu (orexinů)³⁻⁵. Neurony laterálního hypotalamu vylučující hypokretin se spojují s neurony centrálního nervového systému, které se podílejí na regulaci příjmu potravy, spánku a bdění, neuroendokrinní homeostáze a na regulaci autonomního nervového systému^{6,7}. Úbytek těchto neuronů u narkoleptických pacientů vedl k hypotéze, že narkolepsie je autoimunitní proces vyvolaný v hypotalamu⁸.

U narkolepsie se dlouho předpokládala imunitně zprostředkovaná patologie vzhledem k její mimořádně úzké asociaci s alelou MHC II. třídy HLA-DQB1*06:02. Kromě toho se v poslední době objevily genetické důkazy, které ukazují souvislost tohoto onemocnění s polymorfismy genů T buněčných receptorů a dalších genů s imunologickým významem⁹.

Více než 98 % narkoleptických pacientů s nízkou hladinou hypokretinu-1 nese alelu HLA-DQB1*06:02, často v kombinaci s alelou HLA-DRB1*15:01, a narkolepsie tak představuje jednu z nejsilnějších asociací s HLA¹⁰. Nicméně i když téměř všichni pacienti s narkolepsií exprimují alelu DQB1*06:02, její exprese se neomezuje pouze na narkoleptické jedince; nositeli této alely je 12 až 38 % běžné populace¹¹.

4- Princip pracovního postupu

Test je založen na technologii PCR v reálném čase s hydrolyzními sondami. Každý vzorek je analyzován pomocí:

- Páru primerů pro amplifikaci alel HLA-DQB1*06:02 a páru primerů pro amplifikaci fragmentu genu *GAPDH*, který slouží jako vnitřní pozitivní kontrola (IPC).
- Hydrolyzní sondy pro detekci alel HLA-DQB1*06:02 značené na 5' konci fluoroforem FAM a hydrolyzní sondy pro detekci genu *GAPDH* (IPC) značené na 5' konci fluoroforem HEX. Obě sondy jsou na 3' konci označeny zhášedlem, které inhibuje emisi fluorescence fluoroforem, když je sonda neporušená.

V průběhu PCR reakce štěpí 5' aktivita Taq polymerázy sondy hybridizované s jejich komplementární sekvencí, čímž dochází k oddělení fluoroforu od zhášedla a vzniku fluorescenčního signálu úměrného množství vytvořeného PCR produktu, který je monitorován v reálném čase v PCR přístroji. Tudíž:

- V případě vzorků s jednou nebo dvěma kopiemi alely HLA-DQB1*06:02 (DQB1*06:02 pozitivní) se sondy značené FAM vážou na své komplementární sekvence DNA, sonda značená HEX se váže na svou komplementární sekvenci DNA v IPC a je pozorováno následující:

- Fluorescenční signál v kanálu FAM (λ_{\max} 518 nm) a
- Fluorescenční signál v kanálu HEX (λ_{\max} 556 nm).
- V přítomnosti vzorků bez kopií alel HLA-DQB1*06:02 (DQB1*06:02 negativní) se sonda značená HEX váže na komplementární sekvenci DNA v IPC a je pozorována následující situace:
 - Žádný signál nebo slabý signál v kanálu FAM a
 - Fluorescenční signál v kanálu HEX.

5- Obsah sady

→ GVS-NP-24 (24 testů)

- GVS-NP-PM: Modrý uzávěr: 1 lahvička x 192 μ l směsi primerů (PM)
- GVS-NP-MM: 1 lahvička x 240 μ l Master Mix (MM) - červený uzávěr
- GVS-NP-C+: 1 lahvička x 15 μ l Pozitivní kontrola (C+) - zelený uzávěr
- GVS-RB: 1 injekční lahvička x 100 μ l Reaction Blank (RB) - přírodní uzávěr

→ GVS-NP-48 (48 testů)

- GVS-NP-PM: 2 lahvičky x 192 μ l Primer Mix (PM) - modrý uzávěr
- GVS-NP-MM: 2 lahvičky x 240 μ l MasterPrimer Mix (MM) - červený uzávěr
- GVS-NP-C+: 1 lahvička x 15 μ l Pozitivní kontrola (C+) - zelený uzávěr
- GVS-RB: 1 injekční lahvička x 100 μ l Reaction Blank (RB) - přírodní uzávěr

6- Skladování sady

Všechny součásti sady musí být po obdržení skladovány při teplotě od -30 °C do -18 °C. Za těchto podmínek jsou stabilní až do data expirace uvedeného na štítku.

Neprovádějte více než 3 cykly zmrazení/rozmrazení lahviček soupravy, protože to může snížit citlivost testu a ovlivnit výsledky. Pokud se mají testy provádět s malým počtem vzorků, doporučuje se použít alikvotní části reagentů, aby se nepřekročil doporučený počet cyklů zmrazení/rozmrazení.

Vzhledem k fotocitlivé povaze Primeru se vyvarujte trvalého vystavení světlu.

7- Požadované, ale nedodávané materiály

Obecné

- Jednorázové rukavice
- Laboratorní plášť

Spotřební materiál

- Filtrační koncovky (P200, P20 a P10)
- 1,5 ml autoklávované zkumavky
- Kompatibilní spotřební materiál pro každý přístroj PCR v reálném čase

Vybavení

- Vortex - vírový mixér
- Centrifuga

- Mikropipety (P200, P20 a P10)
- Přístroj pro PCR v reálném čase s detekčními kanály FAM a HEX/VIC. Byly ověřeny následující přístroje:
 - 7500, QuantStudio™ 5 a QuantStudio™ 6 Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems™.
 - LightCycler® 96 a LightCycler® 480 System, Roche.
 - Rotor-Gene® Q, Qiagen® .
 - DT Lite Real-Time PCR System, DNA-Technology.
 - qTOWER³, Analytik Jena.
 - CFX 96 Real-Time PCR, BioRad.
 - Mic qPCR, Molecular Systems.

Tato sada je kompatibilní s automatickými pipetovacími systémy, jako jsou OMNIA (Masmec Biomed), OT-2 (Opentrons) a epMotion® 5075 (Eppendorf). Ve všech případech musí být před použitím této soupravy provedena validační zkouška těchto systémů.

8- Odběr vzorků a příprava

Vzorky musí být odebírány v souladu s návodem k použití odběrového zařízení (není součástí soupravy) a podle národních a mezinárodních pokynů.

Tento test by měl být prováděn pouze s DNA extrahovanou ze vzorků plné krve konzervovaných antikoagulačními látkami, jako je EDTA (podrobnosti viz oddíl 12).

Tato technika je kompatibilní s několika metodami extrakce DNA. Byly testovány některé interferující látky, které by mohly ovlivnit výsledek (viz oddíl 12). Před poskytnutím výsledků s diagnostickým účelem by měla být provedena validační zkouška s takovou extrakční metodou.



POZOR!

Se všemi biologickými a krevními vzorky je třeba zacházet jako s potenciálně infekčními. Při manipulaci s nimi dodržujte odpovídající základní a univerzální bezpečnostní opatření.

9- Postupy použití

→ Nastavení PCR

DOPORUČENÍ.



- Definujte pre- a post amplifikační pracovní prostor. Pracovní oblasti, které by měly být odděleny, aby se snížilo riziko kontaminace. Připravte PCR v oblasti pre- PCR
- Používejte laboratorní plášť a jednorázové rukavice.
- Pracujte na ledu nebo nad chladným blokem. Zkraťte dobu mezi přípravou destičky a zahájením testu na minimum.
- Pro každý test se doporučuje testovat negativní kontrolu (Reaction Blank) a pozitivní kontrolu (C+) dodanou se sadou.

1. Před zahájením testu rozmrazte všechny součásti soupravy. Vortexujte lahvičku se směsí primerů a pečlivě promíchejte lahvičku s master mixem. Krátce odstředte, abyste zachytili objem na dně zkumavek.

2. Připravte reakční směs pro n+1 vzorků s použitím množství uvedených v následující tabulce:

	Objem na vzorek (μl)
Master Mix	10
Primer Mix	8

Jemně promíchejte a odstředte, aby se veškerý objem usadil na dně zkumavky.

- Pipetujte 18 μl této směsi do PCR destiček/zkumavek.
- Do každé jamky přidejte 2 μl DNA (doporučená koncentrace mezi 10 a 200 ng/μl), slepou reakci nebo pozitivní kontrolu (C+).
- Uzavřete destičku/zkumavku pomocí vhodného těsnicího prostředku, krátce vrtexujte a krátce stočte, aby se veškerý objem usadil na dně jamky. Pokud je to možné, ujistěte se, že v jamkách nejsou žádné bubliny.
- Umístěte destičku/zkumavky do termocykleru a nastavte amplifikační program termocykleru, jak je popsáno v následující části.

→ Konfigurace termocykleru

- Nastavte následující čtecí kanály:
 - Kanál FAM pro detekci sond značených FAM.
 - Kanál HEX/VIC pro detekci sond s označením HEX.
- Nastavte příslušný profil amplifikace* a spusťte běh:

	Cykly	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)	Analýza
Denaturace	1	95	05:00	X
Cykly	40	95	00:10	X
		64	00:30 (*)	Jednotlivé stránky
Chlazení	1	15	∞	X

(*) U termálních cyklérů Rotor-Gene® (Qiagen) a DT-Lite (DNA-Technology) pro PCR v reálném čase nastavte následující amplifikační program:

	Cykly	Teplota (°C)	Čas (mm:ss)	Analýza
Denaturace	1	95	05:00	X
Cykly	40	95	00:10	X
		64	00:25	Single
Chlazení	1	15	∞	X

→ Likvidace

S odpadními produkty se nakládá v souladu s místními předpisy.

10- Výsledky

→ Vizualizace výsledků

Analýza výsledků se provádí pomocí specifického softwaru použitého přístroje pro PCR v reálném čase a podle pokynů výrobce.

Po dokončení běhu vyberte lineární stupnici pro vizualizaci amplifikačních křivek. Před pokračováním v interpretaci výsledků se doporučuje zkontrolovat správné chování získaných amplifikačních křivek:

- Amplifikační signál je považován za pozitivní, pokud je pozorován rychlý a pravidelný nárůst hodnot fluorescence (exponenciální amplifikace) s $Ct < 35$.
- Slabý fluorescenční, lineární nebo exponenciální signál na pozadí s $Ct > 35$ by neměl být považován za pozitivní amplifikaci. Tento test umožňuje detekci některých alel zahrnutých do skupiny vysoce polymorfních alel HLA, mezi nimiž byly popsány malé rozdíly v jejich sekvencích. Proto lze v kanálu FAM pozorovat slabé nespecifické signály od jiných sekvencně podobných, ale nedetekovaných alel HLA. Výskyt těchto signálů neznamena neplatnost testu.

Vzorek je považován za pozitivní, pokud dojde k exponenciální amplifikaci s $Ct < 35$. Vzorek je považován za negativní, pokud produkuje neexponenciální amplifikaci s nízkou intenzitou nebo exponenciální amplifikaci s hodnotou $Ct > 35$.

Vzorky s anomálními amplifikačními křivkami musí být znovu testovány.



POZOR!

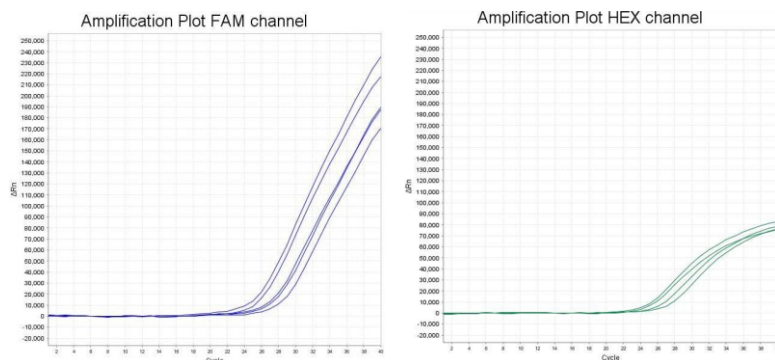
Chcete-li určit hodnotu Ct v každém kanálu, nastavte prahovou čáru následujícím způsobem:

Zvolte lineární zobrazení a vyberte oblast, kde je fluorescenční signál stabilní před exponenciálním zesílením. Umístěte prahovou čáru nad tento signál pozadí tak, aby procházela blízko inflexního bodu amplifikační křivky. Tato čára by měla mírně přesahovat hodnotu nejvyšší fluorescence získané s negativními vzorky pro alelu detekovanou v tomto kanálu.

→ Interpretace výsledků

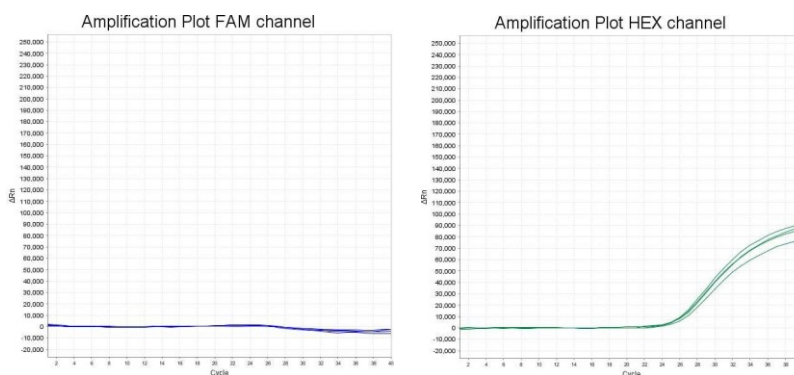
Výsledky získané s touto sadou je třeba interpretovat pomocí vizualizace amplifikačních křivek v kanálech FAM i HEX. Zvolte "lineární stupnici" a určete nepřítomnost/přítomnost vhodných amplifikačních křivek v každém kanálu.

HLA-DQB1*06:02 pozitivní vzorky



Exponenciální amplifikační křivky s $Ct < 35$ v kanálech FAM a HEX

HLA-DQB1*06:02 negativní vzorky



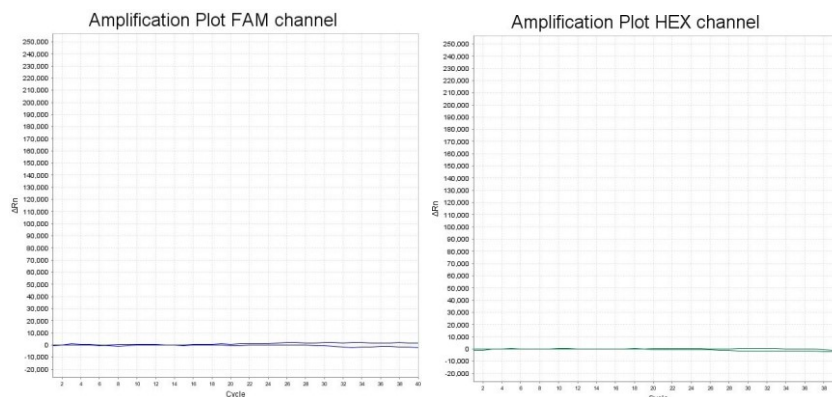
Žádný signál nebo signál s nízkou intenzitou v kanálu FAM a exponenciální zesílení v kanálu HEX (Ct<35).

11- Kontrola kvality

Tato sada obsahuje slepou reakci a pozitivní kontrolu (C+), které je třeba testovat v každém testu. Odpovídající chování kontrolních vzorků je zárukou správného fungování soupravy.

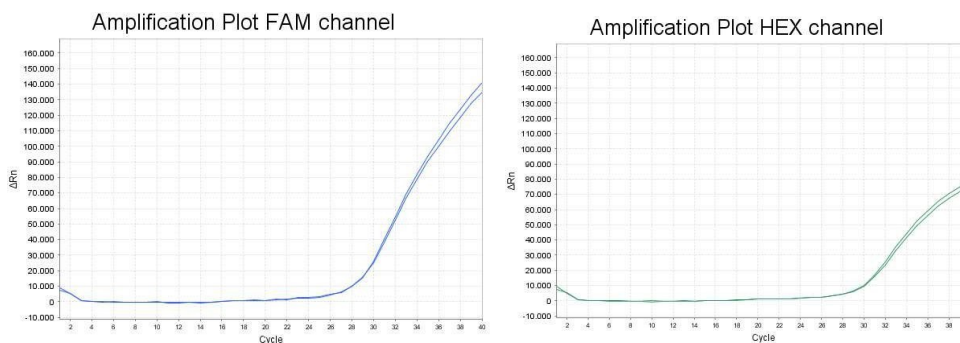
Test je považován za platný, pokud je u kontrolních vzorků pozorován následující amplifikační vzorec:

Reakce na prázdnou



Žádný signál nebo signál s nízkou intenzitou (Ct>35) v kanálech FAM i HEX.

Pozitivní kontrola (C+)



Exponenciální amplifikace s hodnotou Ct<35 v kanálech FAM i HEX.

IPC se detekuje v kanálu HEX a používá se jako vnitřní pozitivní kontrola pro každý analyzovaný vzorek. Proto je výsledek vzorku považován za platný, pokud je v kanálu HEX alespoň sigmoidní amplifikace s Ct<35.

Pokud je u výše uvedených kontrol zjištěno odpovídající chování, pokračujte v interpretaci vzorků, jak je uvedeno v předchozím oddíle.

Výsledek je třeba považovat za neplatný a je třeba jej zopakovat, pokud:

- Amplifikační křivka s Ct<35 je pozorována v kanálech FAM a/nebo HEX v Reaction Blank.
- V pozitivní kontrole je pozorován neexponenciální amplifikační signál nebo se objeví amplifikační signál s Ct>35.
- Vzorky DNA s amplifikačními křivkami s Ct>35 v kanálech FAM a/nebo HEX musí být považovány za pochybné a měly by být znovu testovány provedením nové extrakce DNA.

12- Specifická operace data

→ Analytická specifita

Analytická specifita soupravy Genvinset® HLA Narcolepsy byla analyzována na základě:

- Výsledky získané při interní validaci této soupravy, kdy byly v našich zařízeních analyzovány studie s různými vzorky gDNA, které byly dříve typizovány alternativní metodou. Výsledky soupravy Genvinset® HLA Narcolepsy se plně shodují s výsledky genotypizace získanými alternativní metodou. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Předchozí metoda	Souprava Genvinset® HLA pro narkolepsii	
	DQB1*06:02 pozitivní	DQB1*06:02 negativní
HLA-DQB1*06:02 pozitivní	27	0
HLA-DQB1*06:02 negativní	0	60

- Navázání sekvence primerů a sond s databází genomové DNA. Nebyly zaznamenány žádné jevy křížové reakce s jinými oblastmi DNA.
- Navázání sekvence primerů a sond s databází IPD-IMGT/HLA. Je možné, že intronické oblasti některých nefrekventovaných alel nebyly dosud sekvenovány, takže vazba *in silico* primerů a sond v těchto oblastech není známa. Je vytvořena zpráva se seznamem zjištěných alel a bez testovaných alel s možnou nízkou intenzitou signálu. Tato zpráva je každoročně aktualizována a lze ji nalézt na *adrese* www.bdrdiagnostics.com.

Byl analyzován vliv některých exogenních a endogenních potenciálně interferujících látek na výsledky soupravy Genvinset® HLA Narcolepsy a byly vypočteny hodnoty IC50. Tyto látky byly přidány ke gDNA, která byla následně analyzována pomocí soupravy Genvinset® HLA Narcolepsy. Anomální amplifikační vzorce, které vedly k nesprávným výsledkům, byly získány v přítomnosti následujících koncentrací v gDNA: hemoglobin v rozmezí 1,14 až 1,77 g/l, 0,555 mM FeCl₃ a 6,94 mM K₂-EDTA. Hodnoty IC50 jsou uvedeny v následující tabulce:

Látka	IC50
Hemoglobin	0,54 g/l
Imunoglobulin G	2,43 g/l
FeCl3	0,32 mM
K2-EDTA	1,30 mM
Ethanol	13.96 %

Přítomnost potenciálně inhibičních látek musí být při extrakci a purifikaci DNA eliminována. Před poskytnutím výsledků s diagnostickým účelem by měla být provedena validační zkouška s takovou extrakční metodou.

→ Analytická citlivost

LoD: Ředící test byl proveden s použitím dvou vzorků DNA (HLA-DQB1*06:02 pozitivní a DQB1*06:02 negativní). Testované vstupní hladiny DNA se pohybovaly od 40 ng do 0,016 ng (**) v trojnásobném ředění. Každá úroveň byla testována ve třech opakováních. Byly získány následující údaje:

- Mez detekce = 1,48 ng (Ct<35)

Horní mez: Dva vzorky (DQB1*06:02 pozitivní a DQB1*06:02 negativní) byly testovány v sérii dvojnásobného ředění v rozmezí 800 ng až 6,25 ng (**). Výkonnost testu zůstala přijatelná při všech vstupních úrovních: vhodné sigmoidální amplifikační křivky a genotypová volání byla přesně provedena při všech úrovních (s hodnotami Ct<35).

(**) Koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

→ Diagnostická citlivost a specificita

Různé vzorky DNA byly analyzovány v různých laboratořích. Tyto vzorky byly dříve typizovány pomocí metodiky genotypizace odlišné od Genvinset® HLA Narcolepsy. Byly získány následující výsledky:

		Souprava Genvinset® HLA pro narkolepsii	
		HLA-DQB1*06:02 pozitivní	HLA-DQB1*06:02 negativní
Předchozí metoda	HLA-DQB1*06:02 pozitivní	19	0
	HLA-DQB1*06:02 negativní	0	72

Výsledky získané pomocí soupravy Genvinset® HLA Narcolepsy a genotypy dříve získané jinou typizační metodou se shodují na 100 %.

→ Přesnost

Studie opakovatelnosti spočívají v měření variability v rámci série prostřednictvím analýzy replik všech druhů vzorků, které lze pomocí soupravy stanovit (HLA- DQB1*06:02 pozitivní a negativní vzorky). Každý vzorek byl analyzován ve dvou opakováních.

Souprava Genvinset® HLA Narcolepsy vykazovala 100% opakovatelnost.

Byla provedena studie ke stanovení reprodukovatelnosti činidla. Umožňuje odhadnout variabilitu mezi jednotlivými sériemi, šaržemi a termálními cykly v reálném čase. Použité vzorky představují celý rozsah očekávaných analytů, které lze měřit pomocí soupravy Genvinset® HLA Narcolepsy, tj,

HLA-DQB1*06:02 pozitivní a negativní vzorky. Tři různé šarže ve třech různých termálních cyklerech PCR v reálném čase byly testovány různými operátory.

Souprava Genvinset® HLA Narcolepsy vykazovala 100% reprodukovatelnost.

→ Pravidlost

Správnost analytického postupu soupravy Genvinset® HLA Narcolepsy se posuzuje porovnáním s referenční metodou. Studie byla vypracována jako interní validace činidla, v níž byla prokázána pravdivost se 100% hodnotou. Viz oddíl "Analytická specifita".

13- Omezení postupu

- Souprava detekuje alely HLA-DQB1*06:02 zahrnuté v "HLA alleles detected_GVS-Narcolepsy" na adrese www.bdrdiagnostics.com. Vzhledem k vysoce polymorfní povaze alel HLA se mohou objevit slabé signály z jiných alel podobných sekvencí.
- Mutace nebo polymorfismy v místech žíhání primerů/sond mohou mít za následek nedostatečnou definici alel. K vyřešení typizace může být nutné použít jiné technologie.
- Všechna doporučení uvedená v tomto dokumentu by měla být pečlivě dodržována. Jakékoli výkony, které nesplňují tyto údaje, mohou vést ke špatným výsledkům.
- Nepoužívejte soupravu, pokud existuje podezření na možnou ztrátu reaktivity, kontaminaci, poškození vnějšího boxu nebo jakýkoli jiný případ, který by mohl ovlivnit výkon soupravy.
- Veškerá manipulace s činidly Genvinset® musí být prováděna v souladu se správnou laboratorní praxí a přizpůsobena místním předpisům.
- Nemíchejte komponenty z jiných sad nebo čísel šarží.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby použitelnosti. Prošlé reagenty zlikvidujte v souladu s platnými předpisy.
- Termocykler pro PCR v reálném čase musí být kalibrován podle doporučení výrobce a měl by být používán v souladu s pokyny výrobce.
- Vzhledem ke složitosti typizace HLA musí údaje a interpretaci výsledků revidovat kvalifikovaný personál.
- Slouží jako pomocný nástroj pro diagnostiku pacientů s podezřením na poruchy spojené s HLA-DQB1*06:02. Tyto výsledky používejte ve spojení s klinickými údaji a výsledky dalších testů provedených u pacienta.

14- Řešení problémů průvodce

→ V žádném vzorku není detekován amplifikační signál (ani v pozitivních kontrolách) nebo je jeho intenzita velmi nízká.

- Přístroj PCR v reálném čase není správně naprogramován. Tepelný profil není správný/čtecí kanály nejsou správně nakonfigurovány/ vybrané fluorofory nejsou vhodné.
 - Zkontrolujte, zda byl přístroj správně naprogramován.
- Pozice vzorků a kontrol uvedených při přípravě testu neodpovídají pozicím, ve kterých byly umístěny v přístroji.
 - Správně přiřaďte polohu vzorků.
- Činidlo nefunguje správně.

- Zajistěte, aby byla souprava skladována při vhodné teplotě (mezi -30°C a -18°C) a chráněna před světlem. Vyhněte se zbytečným cyklům zmrazování a rozmrazování. Nepoužívejte ji po uplynutí doby použitelnosti.
- Uvedená množství jednotlivých činidel nebyla do reakční směsi přidána.
 - Zkontrolujte objem jednotlivých složek přidaných do směsi.
- Použitý spotřební materiál není kompatibilní s používaným zařízením.
 - Ujistěte se, že byl použit správný spotřební materiál (kompatibilní s použitým přístrojem pro PCR v reálném čase).

→ V klinických vzorcích nebyl zjištěn žádný signál (signál se objevuje v pozitivní kontrole)

- Špatná kvalita použité DNA.
 - Zkontrolujte poměr absorbance 260/280 a vyřadte nekvalitní vzorky. Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Opakujte odběr vzorků a extrakci DNA.
- Nedostatečná koncentrace DNA.
 - Upravte koncentraci DNA na doporučené rozmezí.
 - Zkontrolujte, zda je koncentrace DNA nad mezí detekce.
- Inhibice amplifikace.
 - Odeberte plnou krev do zkumavek s protisrážlivým činidlem, například EDTA.
- Nebyl přidán žádný vzorek.
 - Opakujte test a ujistěte se, že byly přidány všechny vzorky.

→ Signál detekovaný v negativní kontrole

- Chyba dávkování (pipetování).
 - Při každém přidání DNA do jamky vyměňte špičku pipety. Zkontrolujte, zda vzorek přidaný do jamky odpovídá tomu, co je napsáno v pracovním listu.
- Kontaminace injekční lahvičky Primer Mix/Master Mix/Reaction Blank.
 - Test opakujte s čerstvými alikvoty.
- Prostor pro přípravu PCR je kontaminovaný.
 - Čistěte povrchy, nástroje, laboratorní pláště a vyměňujte spotřební materiál a reagenty. Zopakujte analýzu.

→ Intenzita fluorescence se liší mezi vzorky nebo abnormální amplifikační křivky

- Znečištění vně reakční zkumavky ruší detekci fluorescence.
 - Zařízení důkladně vyčistěte. Zkontrolujte, zda je vnější strana zkumavek/desek čistá. S destičkou/zkumavkou manipulujte v rukavicích.
 - Objem není na dně jamky nebo se v něm vyskytují bublinky.
 - Před vložením do termálního cyklu zkumavky/plotny odstředěte.
 - Zkontrolujte, zda se neobjevují bubliny. Pokud ano, krátkým otáčením je odstraňte.
- Deska/trubky nebyly správně uzavřeny.
 - Zopakujte test a zkontrolujte, zda byly zkumavky/plotny správně uzavřeny.
- Byly použity DNA o různých koncentracích nebo použitý vzorek obsahuje inhibitor reakce.
 - Opakujte odběr vzorků a extrakci DNA.
- Přítomnost polymorfismů nebo mutací na vazebných místech sondy/primeru.
 - Kontakt naše Technickou stránku . oddělení na adrese customerupport@bdrdiagnostics.com
- Přítomnost rušivých látek:

- Vyhněte se přítomnosti inhibitorů. Test opakujte s novým odběrem vzorků a extrakcí DNA.

15- Odkazy

- 1) Hale, L., Guan, S., Emanuele, E.. Epidemiologie narkolepsie. In: Goswami, M., Thorpy, M., Pandi-Perumal, S. (eds) Narcolepsy. Springer, Cham, (2016).
- 2) Szabo ST, Thorpy MJ, Mayer G, Peever JH, Kilduff TS. Neurobiologické a imunogenetické aspekty narkolepsie: Důsledky pro farmakoterapii. Sleep Med Rev. 43:23-36, (2019).
- 3) Nevsimalova S et al.: S.: Narcolepsy: clinical differences and association with other sleep disorders in different age groups. J Neurol, 260:767-775, (2012).
- 4) Sakurai T et al.: Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell, 92:573-585, (1998).
- 5) De Lecea L et al.: hypocretins: hypothalamus-specific peptidy s neuroexcitační aktivitou. ProcNatAcadSci USA, 95:322-327, (1998).
- 6) Bonnavion P, de Lecea L: Hypokretin v řízení spánku a bdění. CurrNeuroNeurosci Rep, 10:174- 179, (2010).
- 7) Dalal J a kol.: Dalal: Translational profiling of hypocretin neurons identifies candidate molecules for sleep regulation. Genes Dev, 27:565-578, (2013).
- 8) Andlauer O et al.: Predictors of hypocretin (orexin) deficiency in narcolepsy without cataplexy. Sleep, 35 1247- 55F, (2012).
- 9) Liblau, R.S., Latorre, D., Kornum, B.R. et al. Immunopatogeneze narkolepsie typu 1. Nat Rev Immunol, (2023).
- 10) Mignot E et al.: HLA DQB1*0602 je spojena s kataplexií u 509 narkoleptických pacientů. Sleep, 20:1012-1020, (1997).
- 11) Han F a další: HLA-DQ asociace a konkurence alel u čínské narkolepsie. Tkáňové antigeny, 80:328-335, (2012).

16- Upozornění pro kupujícího








- Tento produkt byl vyvinut pro diagnostické účely *in vitro*.
- Pokud je souprava používána na území kteréhokoli členského státu Evropské unie, musí uživatel v případě, že dojde k závažné události týkající se použití soupravy, tuto skutečnost nahlásit výrobci (regulatory@bdrdiagnostics.com) a příslušnému orgánu své země a/nebo země pacienta. Hlášení závažných incidentů pro všechny ostatní země musí být provedeno v souladu s místními požadavky pro každou zemi.
- Souhrn bezpečnosti a výkonnosti (SSP) je nahrán do databáze EUDAMED a je přístupný uživatelům soupravy (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home>).
- Produkty společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. by neměly být dále prodávány, upravovány za účelem dalšího prodeje nebo používány k výrobě jiných komerčních produktů bez písemného souhlasu společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.
- Veškeré informace obsažené v tomto dokumentu mohou doznat změn bez předchozího upozornění. Společnost Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. nenese žádnou odpovědnost za případné chyby v dokumentu. Tento dokument je považován za úplný a přesný v době jeho zveřejnění. Společnost Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U. v žádném případě nenese odpovědnost za náhodné, zvláštní, vícenásobné nebo odvozené škody vzniklé v důsledku použití tohoto dokumentu.
- Nákupem tohoto produktu získává kupující práva na některé patenty společnosti Roche, které se používají pouze k poskytování diagnostických služeb *in vitro*. Neuděluje žádný generický patent ani žádné jiné patenty zaměřené na jiné než uvedené použití.
- FAM™ a HEX™ jsou ochranné známky společnosti Life Technologies Corporation.
- Na FAM™ a HEX™ se může vztahovat jeden nebo více patentů společnosti Applied Biosystems, LLC. Kupní cena tohoto produktu zahrnuje omezená, nepřenosná práva.
- TaqMan® je registrovaná ochranná známka společnosti Roche Molecular Systems, Inc.

- Genvinset® je registrovaná ochranná známka společnosti Blackhills Diagnostic Resources, S.L.U.

17- Kontrola změn

Verze	Popis úpravy
Rev. 05	Snížení počtu cyklů PCR
Rev. 06	Bylo zahrnuto označení UDI-DI a CE doplněné číslem NB, které osvědčuje podle IVDR. Nový oddíl "Informace o bezpečnosti". Aktualizace záměru použití. Aktualizace oddílu "Skladování soupravy", "Odběr a příprava vzorků", "Omezení postupu", "Průvodce řešením problémů" a "Upozornění pro kupujícího". Změny v prezentaci činidla. Změna objemu PM a pozitivní kontroly. Změny v tepelném profilu. Změna konečného reakčního objemu. Změna v seznamu validovaných přístrojů pro PCR v reálném čase. Změna v oddílech tohoto dokumentu. Změna informací obsažených ve Specifických údajích o provozu. Změny v LoD.

18- Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>		Datum vypršení platnosti
	Katalogové číslo		Obsah dostačující pro <n> testů
	Číslo šarže		Výrobce
	Teplotní limit		Chraňte před slunečním zářením
	Pozitivní kontrola		Prostudujte si elektronický návod k použití
	Tento výrobek splňuje požadavky nařízení (EU) 2017/746 o <i>in vitro</i> diagnostických zdravotnických prostředcích		